

氏 名	渥美 聡孝
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第38号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	漢方生薬蒼朮の抗炎症作用に関する研究
論文審査委員	主査 佐々木 陽平 副査 後藤(中川)享子 副査 山下 克美 副査 猪部 学 副査 垣内 信子

学位論文要旨

Abstract

The number of patients with inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis and lumbar spondylosis is increasing in Japan. The overproduction of NO and overexpression of COX-2, and pro-inflammatory cytokines has been found in the affected areas of these patients, which suggests that reducing inflammatory mediator levels may be therapeutically effective. Atractylodis Lanceae Rhizoma (AL) is one of the Kampo herbs that exhibits an anti-inflammatory effect, and has been included in some Kampo formulas used to cure articular rheumatism and other rheumatic diseases. In this study, I examined the inhibitory effect of a 70 % methanol extract of AL and the compounds isolated from the extract on LPS-stimulated RAW264, a mouse macrophage cell line. The extract reduced NO production and inhibited mRNA expression of the inflammation-related factors COX-2, IL-1 β , IL-6, and TNF- α . I isolated hinesol, β -eudesmol and acetylactractylodinol from the extract, and revealed that hinesol and acetylactractylodinol were effective in reducing NO production and the levels of pro-inflammation related mRNAs, respectively. Hinesol and acetylactractylodinol are characteristic essential oil constituent of AL and these compounds play a specific aroma of AL. This study revealed new findings about the anti-inflammatory effects of AL and its efficacy in the Kampo formula.

【背景】

慢性関節リウマチ（RA）を代表とする炎症性疾患の患者数は、日本の高齢化に伴い増加している。炎症には活性化免疫細胞が関与する複雑なプロセスが関わっており、その中でもマクロファージは炎症性サイトカイン、ケモカインおよび他のメディエーターを放出することによって Th1 細胞の活性化や炎症組織への単球の遊走を誘導するなど炎症反応の調節に重要な役割を果たしている。活性化されたマクロファージは、誘導型一酸化窒素合成酵素（inducible nitric oxide synthase : iNOS）・シクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase : COX）-2 等の炎症性酵素やインターロイキン（interleukin : IL）-1 β ・IL-6 および腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor : TNF）- α などの前炎症性サイトカインを分泌し、細菌やウイルスに対する食食などの生体防御反応を行っている。一方でマクロファージの活性化が持続し、炎症性酵素や前炎症性サイトカインの分泌が過剰になることが RA の原因になると考えられており、NO・COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α といった、炎症性酵素や前炎症性サイトカインをコントロールすることが RA の治療上有用である。しかしながら、従来使用されてきた医薬品や近年登場した抗体医薬品は、副作用や患者の経済的負担等が問題となっている。

近年、RA に対して越婢加朮湯と柴胡剤の併用が有効であるとの報告や、変形性膝関節症の疼痛歩行能障害や腫脹に対して越婢加朮湯や防己黄耆湯が有意な改善を示すことが報告

され、漢方薬による RA をはじめとする炎症性疾患への効果が示されている。漢方薬は西洋薬に対する代替療法として薬価が比較的安く経済的負担が小さいこと、経口投与で用いられることから、RA 治療における従来の医薬品や抗体医薬品を適応しにくい患者が利用出来る重要な代替医薬品である。そこで本研究では、RA に対する効果が報告されている上記の漢方処方に使用される生薬を中心として、19 種を選抜し、NO 産生の抑制効果を指標に抗炎症効果を検討した。また、その中でも特に高い NO 産生抑制効果を示した蒼朮について iNOS や前炎症性サイトカインの mRNA 発現抑制作用の検討とその活性成分の解明を試みた。

【方法】

・ NO 産生抑制作用

生薬は粉末化後、70%メタノールで超音波抽出した。抽出エキスを減圧下で濃縮し、DMSO で溶解して 100 mg/mL の試験溶液を調製した。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 を 24 well plate に播種して 37°C, 5%CO₂ 下で一晩プレインキュベートした後、生薬抽出エキスを添加した（生薬抽出エキスの最終濃度:100 µg/mL, DMSO の最終濃度:0.1%）。生薬抽出エキスをもしくはポジティブコントロール（デキサメタゾン, 最終濃度:10 mM）を加えてから 2 時間後に Lipopolysaccharide (LPS) の刺激下、24 時間後に産生される NO の量を Griess 法で定量した。

・ RT-PCR 法による各種 mRNA の半定量

NO 産生抑制作用の検討と同様に処理した RAW264 について、LPS 刺激 8 時間後に全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA から cDNA を作成し iNOS・COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α に対応したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をエチジウムブロマイド含有 1.5 %アガロースゲルで電気泳動を行い、302 nm の紫外線照射によって起こる蛍光をゲル撮影装置にてデジタル撮影し、蛍光強度を数値化した。数値化した発光強度は内部標準遺伝子として増幅した GAPDH の発光強度で割ることにより標準化した。

【結果および考察】

・ NO 産生抑制作用

生薬 70%メタノール抽出エキス 19 種の内、7 種の生薬エキスが 50%以上の NO 産生抑制作用を示し、蒼朮の抽出エキス（AL70M）が 91.8%の抑制作用を示した。また、蒼朮と原植物が同属（*Atractylodes* 属）である白朮のエキスにも NO 産生抑制作用（67.6%）が確認され、この抑制作用はこれら二つのエキスについて濃度依存的であることが明らかとなった。蒼朮と白朮は古来より『似ているが効能効果は異なる』とされてきた生薬で、白朮は補気、蒼朮は利水として働く。白朮の抗炎症作用に関する報告が複数ある一方で、本来抗炎症作用を示すと思われる蒼朮について、抗炎症作用を検討している報告は少ない。このことから、蒼朮に含まれる抗炎症作用を示す活性成分の探索および他の炎症性メディエーターに対する影響を検討した。

・ iNOS および前炎症性サイトカイン類の mRNA 発現抑制作用

蒼朮の 70 % メタノール抽出エキス (AL70M) は 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で iNOS mRNA の発現量をわずかに抑制した (抑制率 7.8 %)。このことから、AL70M の強力な NO 産生抑制作用は、iNOS の発現減少ではなく、むしろ発現した iNOS に対する抑制作用であると考えられた。AL70M は iNOS 以外の前炎症性サイトカイン mRNA (COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α) の発現に対して抑制的に働く (各 87.8%・80.6%・80.8%・52.7%) ことが示された。RAW264 における COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α の発現機構は、LPS と TLR4 が結合した後、NF- κ B と AP-1 の活性化による転写活性化を通して誘導されることが報告されている。今回の実験で AL70M は iNOS の mRNA 発現量には弱い抑制作用を示した一方で、COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α の mRNA 発現量は大きく抑制した。今回検討した iNOS・COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α はいずれも NF- κ B と AP-1 によって転写活性化されるものであり、iNOS のみ抑制作用が弱かった機構は明らかではない。今後は細胞内情報伝達系に与える影響を深く検討する必要がある。

本検討により AL70M は NO 産生だけでなく、COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α までの幅広い前炎症性サイトカインを抑制することが示されたため、蒼朮における NO 産生抑制作用および前炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制作用を示す活性成分の単離を試みた。

・蒼朮における抗炎症作用を示す活性成分の決定

AL70M を各種有機溶媒によって液-液分配を行い、ヘキサン層 (AL70M-H)・クロロホルム層 (AL70M-C)・酢酸エチル層および水層について NO 産生および前炎症性サイトカイン mRNA 発現量の抑制作用を検討したところ、AL70M-H および AL70M-C に活性を確認した。順層 TLC により、それぞれのエキスに含まれる成分を確認したところ、AL70M-H と AL70M-C は共通して含有する化合物があること、AL70M の TLC スポットの大きさからその共通化合物は AL70M の主たる構成成分であることが考えられた。これらの結果から AL70M の活性化合物が蒼朮の主成分である β -eudesmol と hinesol であると予想し、さらなる分離を試みた。 β -eudesmol と hinesol は一般的な方法では分離が困難であることが知られているが、カラムクロマトグラフィー法に 10 % 硝酸銀シリカゲルを利用することで AL70M-H より 3 種の化合物を単離した。単離した化合物について、NMR スペクトル解析を行い、標準品および文献値とケミカルシフト値を比較したところ、3 種の化合物を β -eudesmol・hinesol・acetylactyloidinol と同定した。各化合物の活性を調べたところ、hinesol と acetylactyloidinol に強い NO 産生抑制作用と前炎症性サイトカイン mRNA 発現抑制作用が確認された (各々 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で NO : 89.2%, 88.8%・COX-2 : 59.4%, 43.7%・IL-1 β : 74.0%, 93.0%・IL-6 : 83.5%, 69.5%・TNF- α : 54.5%, 63.4%) 一方で β -eudesmol にはそれらの作用は見られなかった。今回活性を示した hinesol や acetylactyloidinol は同属植物の根茎を基源とする白朮には含有されておらず、蒼朮の特徴的な化合物である。

抗炎症作用を期待して用いられる蒼朮を含有する漢方薬においては hinesol と acetylactyloidinol がその活性の一端を担っていることが示唆された。さらに、hinesol と acetylactyloidinol は蒼朮の特徴的な精油成分である。Hinesol は β -eudesmol と 4 : 6

の割合で複合体を形成し、蒼朮の表面に白色の綿状結晶として現れる。抗炎症作用を期待する漢方薬には、古来蒼朮の良品とされてきた『綿状結晶が多く、油分が多く香りが強い』とする蒼朮を用いる方が良い可能性が考えられる。

本研究により漢方生薬蒼朮について炎症反応に関係する NO の産生と COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α の mRNA 発現を抑制することを明らかにした。また、蒼朮における活性化合物として hinesol と acetylactylodinol を単離した。これらの化合物は蒼朮に含まれる主要な精油および蒼朮表面に現れる綿状結晶の構成成分であり、経験的に良いとされてきた蒼朮の性状について科学的に裏付けするデータを資することができた。

以上、蒼朮の抗炎症作用について新たな知見を得たことは、日本の漢方医療においてエビデンスを供する上で重要な意義をもつものと考えられる。

審査結果の要旨

高齢社会を迎えた日本において慢性関節リウマチ（RA）をはじめとする炎症性疾患の患者数は増加傾向にある。一方、漢方薬は医療における重要性が益しつつあり、RA の治療に対しても複数の処方があることが報告されている。しかし生薬個々での抗炎症作用に関する報告は少なく、生薬の品質レベルでのエビデンスは未解明なままである。

発表者は RA に使用される漢方処方を元に生薬 19 種を選定し、RA の発症・増悪に関与する NO など各種炎症性メディエーターに対する抑制作用を指標に比較を行った。19 種類の 70%メタノール抽出エキス（70M）に対する効果より、①「蒼朮」の 70M（AL70M）が 91.8%の NO 産生抑制作用を示すこと、② AL70M は NO 以外の炎症性メディエーターである COX-2・IL-1 β ・IL-6・TNF- α の mRNA 発現を抑制すること、及び③ AL70M の分画精製より、活性には acetylactylodinol・hinesol が関与すること、を明らかにした。

以上、本研究は RA に使用される漢方処方の構成生薬である「蒼朮」に抗炎症作用を見いだすとともに活性に関与する化合物を特定することに成功した。この結果は、従来「蒼朮」の品質に対し良品とされていた指標も支持している。これらの成果は学術的な重要性に加え、日本の漢方医療における貢献度も大きく、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。